

USO DA QUÍMICA COMPUTACIONAL PARA ESTUDO DE EQUILÍBRIOS QUÍMICOS DE CORANTES XANTÊNICOS COMO SISTEMAS FOTODINÂMICOS

1ª edição

Douglas Vanzin

Uso da Química Computacional para Estudo de Equilíbrios Químicos de Corantes Xantênicos como Sistemas Fotodinâmicos

2024 Douglas Vanzin

1ª edição – 2024

1ª impressão – 2024

Clube de Autores Publicações

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

Vanzin, Douglas

Uso da química computacional para estudo de equilíbrios químicos de corantes xantênicos como sistemas fotodinâmicos / Douglas Vanzin. -- Pitanga, PR : Ed. do Autor, 2024.

Bibliografia.

ISBN 978-65-00-99335-6

1. Microorganismos - Inativação 2. Química
3. Terapias complementares - Obras de divulgação
I. Título.

24-201298

CDD-540

Índices para catálogo sistemático:

1. Química 540

Eliane de Freitas Leite - Bibliotecária - CRB 8/8415

Agradeço profundamente ao querido Professor Dr. Noboru Hioka pela orientação em meu trabalho de mestrado e em muito da minha formação.

Agradeço, em especial, ao Professor Dr. Rodrigo Meneghetti Pontes pelas orientações sobre métodos computacionais e interpretação dos resultados.

PREFÁCIO

O câncer é um mal que assola a humanidade desde sempre. Infelizmente, sua incidência só tem aumentado nas últimas décadas, o que se deve a fatores como poluição, mudanças de hábitos de vida, tabagismo, dentre vários fatores. Diversas terapias médicas têm sido desenvolvidas e aprimoradas para o combate à essa doença, dentre as quais este livro destaca a Terapia Fotodinâmica (TFD).

A TFD utiliza corantes combinados com luz na presença de oxigênio para o tratamento de doenças com crescimento anormal de tecidos (*e.g.* câncer) e no combate de vírus, bactérias, protozoários e fungos, denominada Inativação Fotodinâmica de Microrganismos (IFDMO). Corantes xantênicos, tais como a Eosina Y (bromado) e Eritrosina B (iodado), são derivados halogenados da fluoresceína que têm mostrado grande potencial como fotossensibilizadores (FS) para TFD e IFDMO, porém apresentam um complicado equilíbrio em função do pH do meio e, adicionalmente, algumas espécies protolíticas contêm tautômeros em equilíbrio. Além do pH, a constante dielétrica (ϵ) e interações eletrostáticas com o meio determinam a forma protolítica e

tautomérica presente e, portanto, modulam as propriedades físico-químicas dos FS.

Além disso, esses corantes apresentam fenômenos complexos de inversão de pK_a , já que sua estrutura possui grupo protolítico fenólico ($-OH$) que em determinadas condições mostra-se mais ácido do que seu grupamento ácido carboxílico ($-COOH$); ou seja, $pK_{a-OH} < pK_{a-COOH}$ o que não é comum. Partindo de um meio ácido, com o aumento do pH o equilíbrio protolítico é deslocado de uma forma catiônica para neutra, depois monoaniônica e dianiônica. A forma protolítica neutra pode ser constituída pelos tautômeros: zwitteriônico, quinóide e lactona, enquanto a forma monoaniônica é composta pelos tautômeros carboxilato e fenolato.

Neste trabalho foram calculadas as constantes dos equilíbrios tautoméricos (K_T) da Eosina e Eritrosina a partir das absorvidades molares (ϵ) obtidas experimentalmente em água, misturas DMSO/água e micelas de SDS, CTAB e P-123 para verificar a estabilidade relativa dos tautômeros de acordo com as condições do meio. Estes equilíbrios também foram avaliados calculando K_T por métodos químico-computacionais em água, DMSO e vácuo utilizando a Teoria do Funcional de Densidade (DFT). Foram testados diferentes funcionais como B3LYP e M06-2X, os conjuntos de base DGDZVP, 6-

311++G(d,p) e LANL2DZ(d,p) e os modelos de solvatação IEF-PCM e SMD juntamente com os conjuntos de raios de van der Waals UFF, Pauling e SMD-Coulomb utilizando o pacote Gaussian 09 (UNIX).

Os níveis de teoria obtidos foram avaliados através dos cálculos de K_T e pK_a no estado fundamental e dos espectros de absorção eletrônica (através da DFT dependente do tempo – TD-DFT) no estado singleto excitado, comparando as descrições teóricas com os dados experimentais. Os resultados indicaram quais métodos proporcionaram resultados mais adequados para os cálculos de K_T , pK_a e espectros de absorção. O conjunto de base DGDZVP destacou-se não apenas por descrever corretamente o sistema, mas também por ter baixo custo computacional em relação aos outros testados.

Os resultados de K_T (experimentais e teóricos) e os espectros de absorção de cada tautômero por TD-DFT, em geral, indicaram as espécies tautoméricas mais favoráveis para cada forma protolítica em cada ambiente de solvatação. A maior estabilidade do tautômero monoanionico fenolato em certos meios, mais estável que o carboxilato, parece ser o responsável pelo fenômeno de inversão de pK_a .

A análise estrutural, a distribuição de cargas, os momentos de dipolo (μ), os orbitais naturais de ligação (NBO)

e os orbitais HOMO-LUMO forneceram informações importantes do comportamento de cada espécie em diferentes meios. A maior concentração de cargas sobre o grupo carboxilato e seu maior momento de dipolo em relação ao tautômero fenolato justifica sua maior estabilidade em água para a Eritrosina. Por sua vez, a alta deslocalização de cargas da forma fenolato da Eritrosina, constatada através de análises de NBO, contribui para sua estabilidade em DMSO. Em relação à Eosina, a estabilidade da forma fenolato em água – que causa a inversão de pK_a neste meio – é pouco influenciada pela deslocalização eletrônica, e provavelmente se deve a efeitos estéricos e de solvatação, o qual é favorecido pelo seu alto momento de dipolo. Contribuições na sobreposição de orbitais σ de C–Br e C–I com π^* de C–C contribuem para a deslocalização eletrônica diferenciada da espécie MAF da Eosina e da Eritrosina.

Assim, tendo em vista que em aplicações fotodinâmicas a capacidade de absorção de luz é fundamental, este trabalho evidencia que algumas formas tautoméricas da Eritrosina e Eosina têm absorção de luz limitada, sendo que suas concentrações relativas foram estimadas. Desta forma, este estudo também se mostra importante para compreender o comportamento tão peculiar e complexo destes dois

importantes candidatos a fotossensibilizadores para TFD e IFDMO, contribuindo para a evolução de técnicas importantes de tratamento de doenças graves, que buscam melhorias contínuas nas formas de tratamento.

Douglas Vanzin

SUMÁRIO

PREFÁCIO	V
NOTA DO AUTOR	XIII
CAPÍTULO 1	
TERAPIA FOTODINÂMICA E CORANTES FOTOATIVOS	1
CORANTES XANTÊNICOS	4
ESTUDOS DE pK_a DE CORANTES XANTÊNICOS.....	7
CAPÍTULO 2	
MÉTODOS DE QUÍMICA COMPUTACIONAL	13
FUNDAMENTAÇÃO DOS MÉTODOS MECÂNICO-QUÂNTICOS.....	14
TEORIA DO FUNCIONAL DA DENSIDADE (DFT).....	19
FUNCIONAIS DE TROCA-CORRELAÇÃO	22
CONJUNTO DE FUNÇÕES DE BASE	26
ESTADOS ELETRÔNICOS EXCITADOS	28
TEORIA DO FUNCIONAL DA DENSIDADE DEPENDENTE DO TEMPO (TD-DFT)	29
MODELOS CONTÍNUOS DE SOLVATAÇÃO	31
CAPÍTULO 3	
CÁLCULOS EMPÍRICOS DOS EQUILÍBRIOS DE TAUTOMERIZAÇÃO	39
METODOLOGIA PARA CÁLCULO DO EQUILÍBRIO DE TAUTOMERIZAÇÃO EMPÍRICO	40
RESULTADOS DO EQUILÍBRIO DE TAUTOMERIZAÇÃO EMPÍRICO	42
CAPÍTULO 4	
METODOLOGIAS DE CÁLCULOS COM AS ESTRUTURAS PROTOLÍTICAS E TAUTOMÉRICAS	50
CÁLCULOS COMPUTACIONAIS COM AS ESTRUTURAS PROTOLÍTICAS E TAUTOMÉRICAS	51
<i>Estado Fundamental</i>	51
<i>Estado Excitado</i>	54
CAPÍTULO 5	
EQUILÍBRIOS TAUTOMÉRICOS COM MÉTODOS COMPUTACIONAIS	55
METODOLOGIA DE CÁLCULO	56
RESULTADOS OBTIDOS COM QUÍMICA COMPUTACIONAL NOS EQUILÍBRIOS TAUTOMÉRICOS.....	57

CAPÍTULO 6

PK_a POR MÉTODOS DE QUÍMICA COMPUTACIONAL	68
CÁLCULOS DE PK _a	69
<i>Cálculos de pK_a com o método direto</i>	<i>69</i>
<i>Cálculos de pK_a com o modelo de solvatação implícito-explicito</i>	<i>71</i>
<i>Resultados de pK_a da ERI e ERIMET em água e testes de diferentes</i>	
<i>níveis de teoria</i>	<i>72</i>
<i>pK_a da ERI e ERIMET em DMSO e vácuo</i>	<i>75</i>
<i>pK_a da EOS e EOSMET em água e vácuo</i>	<i>78</i>
<i>pK_a da ERI e EOS através do modelo implícito-explicito</i>	<i>84</i>

CAPÍTULO 7

ANÁLISE ESTRUTURAL E COMPORTAMENTO ELETROSTÁTICO	85
OTIMIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS	86
<i>Análise eletrostática</i>	<i>87</i>
<i>Análise dos Orbitais Naturais de Ligação: Energia de Deslocalização</i>	
<i>Eletrônica</i>	<i>92</i>
<i>Análise dos Orbitais Naturais de Ligação: Distribuição de cargas e</i>	
<i>interações orbitales</i>	<i>96</i>

CAPÍTULO 8

ESPECTROS ELETRÔNICOS DE ABSORÇÃO	105
ESCOLHA DO NÍVEL DE TEORIA	106
ESTUDO DAS TRANSIÇÕES ELETRÔNICAS DAS ESPÉCIES PROTOLÍTICAS E TAUTOMÉRICAS	
.....	111
ORBITAIS HOMO E LUMO E O EFEITO DA CARGA DE COO ⁻ NO GRUPO	
CROMOFÓRICO	122
CONSIDERAÇÕES FINAIS	131
REFERÊNCIAS	135
ANEXOS	154

NOTA DO AUTOR

É notório que a incidência de casos de câncer tem aumentado de forma muito considerável ao longo dos anos. A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) tem divulgado dados da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) com estimativas de que em 2022 houve 20 milhões de novos casos de câncer e 9,7 milhões de mortes decorrentes da doença pelo mundo. Aponta-se ainda que 1 a cada 5 pessoas desenvolverá câncer durante a vida. No entanto, até o ano de 2050, projeta-se um aumento de 77% de novos casos em relação à 2022, devido ao envelhecimento e crescimento da população. Argumenta-se que a maior exposição a fatores de risco conforme o desenvolvimento socioeconômico, dentre eles, alcoolismo, tabagismo, hábitos alimentares, poluição ambiental etc. contribuem para a maior incidência de desenvolvimento da doença (IARC, 2024; OPAS, 2024).

Nesse cenário o aprimoramento e desenvolvimento das modalidades de tratamento de câncer devem ser constantes. Uma modalidade promissora que tem evoluído muito em estudos e aplicações clínicas é a Terapia Fotodinâmica (TFD). Ela consiste em uma técnica que emprega a incidência de luz em um tecido doente, onde se localize um fármaco fotoativo, chamado de fotossensibilizador (FS). A excitação causada pela luz, forma espécies reativas de oxigênio e oxigênio singlete que atacam e necrosam as células cancerosas, causando o efeito terapêutico.

Em trabalho recente, Alvarez e Sevilla (2024) destacam avanços nos tratamentos combinados de TFD com outras técnicas terapêuticas, como quimioterapia, radioterapia e a mais recente e promissora imunoterapia, que estão sendo utilizadas clinicamente e gerando excelentes resultados. Além disso, a TFD também tem se beneficiado dos avanços da nanotecnologia, inclusive com *quantum dots* como fotossensibilizadores inovadores, além dos eficientes corantes já amplamente utilizados.

Outra modalidade importante baseada nos efeitos da luz em fotossensibilizadores é a Inativação Fotodinâmica de Microrganismos (IFDMO). Esta técnica abrangente pode ser usada no combate a fungos, vírus, bactérias e diversos protozoários em áreas que abrangem desde a descontaminação de materiais, alimentos, tratamentos dentários até terapias médicas, como o combate à leishmaniose, por exemplo (Sheng, Li e Wang, 2022; Wang, Kyere e Sadiq, 2021; Vieira *et al.* 2024).

Há uma série de corantes que se destacam como fotossensibilizadores utilizados em TFD e IFDMO. Algumas classes amplamente estudadas e com aplicações terapêuticas são: porfirinas, xantenos, cianinas, antraquinonas, fenotiazinas, dentre outras (D'Alessandro e Priefer, 2020). Dentre estes, os corantes xantênicos fazem parte da segunda geração de FS efetivos para uso oncológico e também na inativação de microorganismos, além de serem especialmente importantes no diagnóstico de doenças através de marcação de tecidos pela emissão de fluorescência. Alguns corantes desta classe que se

destacam são a fluoresceína, aeosina, eritrosina e rosa de bengala (Karaman *et al.*, 2023).

Um dos fatores importantes que limitam a absorção de luz e o rendimento quântico de oxigênio singlete ou espécies reativas de oxigênio é o fato de as espécies aniônicas dos xantenos terem maior absorção de luz que outras formas. Contudo, há várias formas protolíticas possíveis em equilíbrio que dependem do pH do meio. Além disso, em certo pH, algumas formas protolíticas possuem também um equilíbrio tautomérico. Como forma neutra, há três possíveis tautômeros, dos quais a forma lactona não absorve luz visível e, portanto, não causa efeito terapêutico. Na forma protolítica monoanionica, também há diferença na absorvidade de luz entre a espécie carboxilato e fenolato. Cada espécie dessas também é dependente do solvente, do meio de formulação, do tecido alvo em que ficará alojado, dentre outros fatores que interferem na efetividade do seu uso com FS (Freitas *et al.*, 2020 e 2021).

Para ajudar na elucidadação e compreensão de fenômenos complexos, como os referidos equilíbrios dos corantes xantênicos, as ferramentas da química computacional têm sido importantes. Ao comparar os corantes Eosina Y e Eritrosina B, um fenômeno intrigante de inversão de pKa, onde o grupo fenolato é mais ácido que o carboxilato, ocorre na Eosina Y em água e na Eritrosina B em misturas de água/solventes orgânicos. Esse efeito é o inverso do esperado e em relação ao restante dos corantes xantênicos, e foi estudado computacionalmente por Vanzin (2014 e 2016). Partes do

trabalho foram publicados em importantes revistas internacionais nos artigos: *Experimental and computational studies of protolytic and tautomeric equilibria of Erythrosin B and Eosin Y in water/DMSO* (Vanzin *et al.*, 2016) e *Multivariate analysis of protolytic and tautomeric equilibria of Erythrosine B and its ester derivatives in ionic and non-ionic micelles* (Freitas *et al.*, 2020). A relevância de ambos os artigos é evidenciada pela quantidade de outros trabalhos que já os utilizaram como referência, indicado pelo *Web of Science*, que contabiliza, respectivamente, 27 e 15 citações para Vanzin *et al.* (2016) e Freitas *et al.* (2020).

Para ilustrar a importância científica dos temas destacados acima, foi feita uma busca no portal de Periódicos da CAPES filtrando o período dos últimos 10 anos. Para o termo Terapia Fotodinâmica, verifica-se mais de 35 mil artigos científicos, 314 capítulos de livros, 80 livros, dentre outros formatos de trabalhos acadêmicos. Destes, a grande maioria encontra-se escrita em língua inglesa e apenas 133 em língua portuguesa. Já em relação à Inativação Fotodinâmica, no mesmo período encontra-se 2.872 artigos, 20 capítulos de livros e 3 livros, dos quais, apenas 12 são escritos em português. Para corantes xantênicos, encontra-se 4.389 artigos, 31 capítulos de livro e 4 livros, estando apenas 14 destes trabalhos em português.

Em relação aos estudos computacionais feitos com corantes xantênicos nos últimos 10 anos, encontram-se 29 artigos e apenas 1 livro, todos em língua inglesa. Na busca específica por estudos computacionais com a Eosina Y são

encontrados 27 artigos e com a Eritrosina B apenas 2 artigos, todos em inglês.

Sendo assim, constata-se a grande relevância do tema e amplitude dos estudos de TFD e IFDMO, inclusive através de corantes xantênicos como fotossensibilizadores. Percebe-se que a complexidade dos sistemas desses corantes demanda um entendimento mais profundo, tanto de forma empírica quanto computacional. No entanto, os trabalhos computacionais existentes na literatura são pouco numerosos, estando todos em inglês. É neste sentido que a publicação deste livro visa contribuir com a ampliação da gama de trabalhos disponíveis na literatura, principalmente a existente em língua portuguesa.

Os capítulos subsequentes apresentam na íntegra a fundamentação teórica, metodologias e resultados obtidos nos estudos de Mestrado conduzidos de forma computacional para os corantes xantênicos Eritrosina B e Eosina Y em água e DMSO, visando elucidar o fenômeno de inversão de pK_a que ocorre nesses compostos.

A dissertação de Mestrado intitulada *Estudo Computacional dos Equilíbrios Tautoméricos e Protolíticos dos Corantes Eritrosina B e Eosina Y* (Vanzin, 2014), defendida e publicada no Programa de Pós-Graduação em Química (PQU) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), que geraram os artigos internacionais acima citados, aqui foi reorganizada e adaptada no formato de capítulos, mostrando todos os resultados obtidos, na íntegra, para facilitar a compreensão e ampliar o nível de detalhamento. Isso facilita, inclusive, o trabalho de pesquisadores que precisam dar

prosseguimento a esse tipo de estudo ou queiram utilizar metodologias semelhantes em outros sistemas químicos, visto que o estudo computacional de equilíbrios protolíticos e tautoméricos frequentemente dão dores de cabeça para muitos químicos.

Desejo, assim, boa leitura e bom proveito de todas as informações e metodologias apresentadas.

Douglas Vanzin